

FastPure Blood DNA Mini Kit

FastPure 血液基因组小量提取试剂盒说明书 (离心柱型)

产品组成

FastPure Blood DNA Mini Kit		
产品编号	EK-1201-50T	EK-1201-100T
纯化次数	50 次	100 次
DNA Mini Columns	50 个	100 个
2ml Collection Tubes	50 个	100 个
Buffer BL	20ml	40ml
Buffer IRB	17ml	34ml
Buffer BW	12ml	24ml
Buffer ATE	10ml	20ml
Proteinase K Solution	1ml	2ml
RNase A Solution	0.6ml	1.2ml
使用手册	1	1

产品介绍

本试剂盒适用于哺乳动物血液核酸提取，不含苯酚等有毒化学试剂组分，采用独特的缓冲液配方 Buffer IRB 最大限度去除血液抑制剂的影响，同时应用先进的硅胶膜吸附技术，操作简单、快速。得到的 DNA 比传统试剂盒纯度更高，可直接用于酶切、转化、测序及 PCR 等分子生物学实验。

存储条件

本产品除 Proteinase K 溶液和 RNase 溶液外，可在室温(15~25℃)保存 12 个月。低温下 Buffer BL 或 Buffer IRB 可能会有沉淀形成，使用时需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K 溶液和 RNase A 溶液冰

袋运输，收到产品后请分装保存于-20℃。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无菌 1.5/2ml 离心管

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- Buffer BL 和 Buffer IRB 是如有混浊现象，可在 55℃ 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。
- 基因组提取所有步骤都在室温 (15-25℃) 下进行。

开始前试剂准备

- 按瓶子标签所示，Buffer BL 及 Buffer IRB 中加入适量的无水乙醇稀释，于室温密封保存。

DNA 浓度及纯度检测

- 回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测纯度与浓度。
- DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰，OD260 值为 1 相当于大约 50μg/ml 双链 DNA、40μg/ml 单链 DNA。
- OD260/OD280 比值应为 1.7-2.0，如果洗脱时不使用洗脱缓冲液，而使用 ddH₂O，比值会略低，因为 pH 值和离子存在会影响光吸收值，但并不表示纯度低。

应用领域

该方案适合于从约 10μl-1ml 人类的抗凝血液、血清、血浆、尿液、或其它体液样品中直接提取总 DNA。该方案直接对样品进行裂解消化，获得的 DNA 包括了基因组 DNA(如淋巴细胞、线粒体 DNA、游离的 DNA(>100bp)、以及病毒 DNA(如乙肝)等；

操作步骤:**1. 在 1.5-2.0ml 离心管中, 加入 15 μ l Proteinase K 溶液。**

注意: Proteinase K 溶液不能与 Buffer BL 先混合。

2. 转移 250 μ l 抗凝的血液, 血清, 血浆或其它体液样品至蛋白酶的离心管中。轻轻振荡混匀。若血液小于 250 μ l, 用 PBS 或 Buffer ATE 调整总体积至 250 μ l。**3. 加入 250 μ l Buffer BL 至样品中。盖上盖子, 颠倒 3~5 次, 最高速度涡旋混匀 15-20 秒。后 56 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟, 其间涡旋混匀 2~3 次。**

注意: 涡旋时须让裂解液与血液充分混匀才能保证裂解效果。

4. (可选步骤) 若需去除 RNA, 加入 10 μ l RNase A Solution 至裂解液中, 室温静置 10 分钟。**5. 加入 250 μ l 无水乙醇至裂解样品中, 盖上盖子, 快速颠倒 3~5 次, 涡旋混匀 30 秒。****6. 把 DNA 结合柱装在 2ml 收集管中。转移混合液至柱子中, 并以 10,000 \times g 离心 1 分钟。****7. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。加入 500 μ l Buffer IRB 至柱子上并以 10,000 \times g 离心 1 分钟。****8. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。加入 500 μ l Buffer BW (请先检查是否已加入无水乙醇) 至柱子中, 10,000 \times g 离心 1 分钟。****9. 重复操作步骤 8 一次。****10. 倒弃流出液, 把柱子重新装回收集管中。12,000 \times g 离心空柱 2 分钟, 以甩干柱子的残留物质。(这一步要尽量提高离心速度以减少乙醇的残留)。**

注意: 漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应(酶切、PCR 等)实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响, 建议将吸附柱放置到新的灭菌的 1.5ml EP 管中, 并打开盖子于室温放置数分钟(约 10 分钟), 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

11. 将柱子转移至新的 1.5ml 无菌的离心管(自备), 加入 30~100 μ l Buffer ATE 至柱子的膜中央, 静置 2 分钟后以 12,000 \times g 离心 2 分钟收集离心下的基因组 DNA。

Buffer ATE 在 55-60 $^{\circ}$ C 预热后加入膜中央洗脱可提高核酸获得率。

12. 弃去柱子, 将基因组 DNA 溶液于 -20 $^{\circ}$ C 保存(短期可保存 2-8 $^{\circ}$ C) 或进行下游实验。附加方案: 处理 0.25-1ml 的血液 DNA 抽提(注:该方案需要另外订购 Buffer RBC)**1. 转移 0.25-1ml 抗凝血液样品至 2-15ml 离心管中。****2. 加入 2.5 倍体积 Buffer RBC 至样品中, 颠倒混匀 5-10 次并静置 3 分钟。****3. 2,000 \times g 离心 5 分钟。小心倒弃上清液, 并反扣于吸水纸上吸尽残液。(注:倒弃上清液时, 小心不要倒弃细胞核沉淀。)****4. 加入 250 μ l 灭菌水和 25 μ l 蛋白酶 K 溶液到样品中。涡旋 30 秒打散沉淀团。****5. 按前述第 3 步加入 Buffer BL 开始进行操作。****常见问题****1. 柱子堵塞**

- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer BL 混匀不充分。重新提取, 加入 Buffer BL 后先颠倒混匀 3~5 次, 然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer BL 充分混匀。

- **Proteinase K 活性下降:** 重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须保存于 -20 $^{\circ}$ C。Proteinase K 与 Buffer BL 不能预先混合。

- **样品含凝血块:** 处理陈旧的血液样品时, 加大蛋白酶的用量, 或用附加方案进行提取。

- **样品含固体颗粒:** 在第 5 步加入乙醇前, 10,000 \times g 离心 3 分钟去除未消化的杂质, 转移上清液至新的离心管后再加入乙醇。

- **样品用量太多:** 白膜层、浓缩血液、细胞悬液中含有大量的细胞, 减少样品量。

2. DNA 纯度不达标

- **血液样品中存在凝血块:** 加大蛋白酶 K 的用量, 消化过程中用移液枪吸打几次打散凝块。或通过离心去除。处理凝血较多的样品时, 需用匀浆器充分匀浆凝块。

- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer BL 混匀不充分。重新提取加入 Buffer BL 后延长混匀及涡旋时间

3. DNA 产量低

- 血浆或血清等无细胞体液样品, 其 DNA 含量低, 通常只有 ng 级。

- 第 5 步加入乙醇后混匀不充分或乙醇加入的体积不够。

- 洗脱不充分: 洗脱液需加到膜中央, 可增加洗脱体积或次数。